

1FW

CERTIFICATE OF MAILING

I hereby certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service with sufficient postage as first class mail in an envelope addressed to: Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 on January 28, 2005

David H. Brinkman, Reg. No. 40,532

Date

PATENT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant(s): Kazuyoshi Sotoyama et al.
Serial No.: 10/709,674
Filing Date: May 21, 2004
Art Unit: 1761
Confirmation No.: 3673
Examiner: Unknown
Title: **BIFIDOBACTERIUM LONGUM**
Our Ref.: SHG-030P2

Cincinnati, Ohio 45202

January 28, 2005

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENTS

Sir:

Attached are certified copies of Applicants' Japanese Patent No. 2001-374327 filed on 07 December 2001 and PCT International Application No. PCT/JP02/12162 filed on 21 November 2002, the right of priority of which has been and is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. § 119.

Applicants do not believe that any fees are due in connection with this response. However, if such petition is due or any fees are necessary, the

Commissioner may consider this to be a request for such and charge any necessary fees to Deposit Account No. 23-3000.

Respectfully submitted,

WOOD, HERRON & EVANS, L.L.P.



David H. Brinkman
Reg. No. 40,532

2700 Carew Tower
441 Vine Street
Cincinnati, OH 45202
(513) 241-2324 - Voice
(513) 421-7269 - Facsimile

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類は下記の出願書類の謄本に相違ないことを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日
Date of Application:

2002年11月21日

出 願 番 号
Application Number:

PCT/JP02/12162

願 人
Applicant(s):

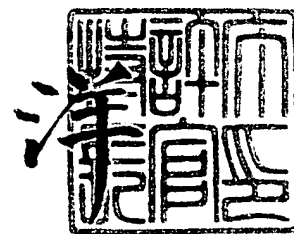
森永乳業株式会社
外山 一吉
平松 明德
肖 金 忠
高橋 典俊
近藤 しずき
八重島 智子
高橋 幸子

CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT

2005年 1月13日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



受理官庁用写し
特許協力条約に基づく国際出願

願 書

出願人は、この国際出願が特許協力条約に従って処理されることを請求する。

国際出願番号	PCT/JP02/12162
国際出願日	21.11.02
(受付印)	PCT International Application 日本国特許庁
出願人又は代理人の書類記号 (希望する場合、最大12字)	PC-8757

第I欄 発明の名称
ビフィドバクテリウム・ロンガム

第II欄 出願人 ☐ この欄に記載した者は、発明者でもある。

氏名(名称)及びあて名:(姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)
森永乳業株式会社

MORINAGA MILK INDUSTRY CO., LTD.

〒108-8384 日本国東京都港区芝五丁目33番1号

33-1, Shiba 5-chome, Minato-ku, Tokyo 108-8384 Japan

電話番号:

ファクシミリ番号:

加入電話番号:

出願人登録番号:

国籍(国名): 日本国 JAPAN

住所(国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である: ☐ すべての指定国 ☒ 米国を除くすべての指定国 ☐ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

第III欄 その他の出願人又は発明者

氏名(名称)及びあて名:(姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

外山 一吉

SOTOYAMA Kazuyoshi

〒228-0004 日本国神奈川県座間市東原五丁目1番83号 森永乳業株式会社 食品総合研究所内
c/o MORINAGA MILK INDUSTRY CO., LTD., Food Research & Development Laboratory, 1-83, Higashihara 5-chome, Zama-shi, Kanagawa 228-0004 Japan

この欄に記載した者は次に該当する:

☐ 出願人のみである。

☒ 出願人及び発明者である。

☐ 発明者のみである。
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

出願人登録番号:

国籍(国名): 日本国 JAPAN

住所(国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である: ☐ すべての指定国 ☐ 米国を除くすべての指定国 ☒ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

☒ その他の出願人又は発明者が続業に記載されている。

第IV欄 代理人又は代表者、通知のあて名

次に記載された者は、国際機関において出願人のために行動する:

☒ 代理人

☐ 代表者

氏名(名称)及びあて名:(姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

6490 弁理士 志賀 正武 SHIGA Masatake

8903 弁理士 渡邊 隆 WATANABE Takashi

〒169-8925 日本国東京都新宿区高田馬場三丁目23番3号 ORビル
OR Bldg., 23-3, Takadanobaba 3-chome, Shinjuku-ku, Tokyo 169-8925 Japan

電話番号:

03-5330-6011

ファクシミリ番号:

03-5330-6061

加入電話番号:

代理人登録番号:

☐ 通知のためのあて名:代理人又は代表者が選任されておらず、上記枠内に特に通知が送付されるあて名を記載している場合は、レ印を付す。

第四欄の続き その他の出願人又は発明者	
この続表を使用しないときは、この用紙を願書に含めないこと。	
氏名（名称）及びあて名：（姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載） 平松 明德 HIRAMATSU Akinori 〒228-0004 日本国神奈川県座間市東原五丁目1番83号 森永乳業株式会社 食品総合研究所内 c/o MORINAGA MILK INDUSTRY CO., LTD., Food Research & Development Laboratory, 1-83, Higashihara 5-chome, Zama-shi, Kanagawa 228-0004 Japan	この欄に記載した者は次に該当する： <input type="checkbox"/> 出願人のみである。 <input checked="" type="checkbox"/> 出願人及び発明者である。 <input type="checkbox"/> 発明者のみである。 （ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと） 出願人登録番号：
国籍（国名）：日本国 JAPAN	住所（国名）：日本国 JAPAN
この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である： <input type="checkbox"/> すべての指定国 <input type="checkbox"/> 米国を除くすべての指定国 <input checked="" type="checkbox"/> 米国のみ <input type="checkbox"/> 追記欄に記載した指定国	
氏名（名称）及びあて名：（姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載） 肖 金忠 XIAO Jin-zhong 〒228-0004 日本国神奈川県座間市東原五丁目1番83号 森永乳業株式会社 食品総合研究所内 c/o MORINAGA MILK INDUSTRY CO., LTD., Food Research & Development Laboratory, 1-83, Higashihara 5-chome, Zama-shi, Kanagawa 228-0004 Japan	この欄に記載した者は次に該当する： <input type="checkbox"/> 出願人のみである。 <input checked="" type="checkbox"/> 出願人及び発明者である。 <input type="checkbox"/> 発明者のみである。 （ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと） 出願人登録番号：
国籍（国名）：中国 CHINA	住所（国名）：日本国 JAPAN
この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である： <input type="checkbox"/> すべての指定国 <input type="checkbox"/> 米国を除くすべての指定国 <input checked="" type="checkbox"/> 米国のみ <input type="checkbox"/> 追記欄に記載した指定国	
氏名（名称）及びあて名：（姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載） 高橋 典俊 TAKAHASHI Noritoshi 〒228-0004 日本国神奈川県座間市東原五丁目1番83号 森永乳業株式会社 食品総合研究所内 c/o MORINAGA MILK INDUSTRY CO., LTD., Food Research & Development Laboratory, 1-83, Higashihara 5-chome, Zama-shi, Kanagawa 228-0004 Japan	この欄に記載した者は次に該当する： <input type="checkbox"/> 出願人のみである。 <input checked="" type="checkbox"/> 出願人及び発明者である。 <input type="checkbox"/> 発明者のみである。 （ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと） 出願人登録番号：
国籍（国名）：日本国 JAPAN	住所（国名）：日本国 JAPAN
この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である： <input type="checkbox"/> すべての指定国 <input type="checkbox"/> 米国を除くすべての指定国 <input checked="" type="checkbox"/> 米国のみ <input type="checkbox"/> 追記欄に記載した指定国	
氏名（名称）及びあて名：（姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載） 近藤 しずき KONDO Shizuki 〒228-0004 日本国神奈川県座間市東原五丁目1番83号 森永乳業株式会社 食品総合研究所内 c/o MORINAGA MILK INDUSTRY CO., LTD., Food Research & Development Laboratory, 1-83, Higashihara 5-chome, Zama-shi, Kanagawa 228-0004 Japan	この欄に記載した者は次に該当する： <input type="checkbox"/> 出願人のみである。 <input checked="" type="checkbox"/> 出願人及び発明者である。 <input type="checkbox"/> 発明者のみである。 （ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと） 出願人登録番号：
国籍（国名）：日本国 JAPAN	住所（国名）：日本国 JAPAN
この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である： <input type="checkbox"/> すべての指定国 <input type="checkbox"/> 米国を除くすべての指定国 <input checked="" type="checkbox"/> 米国のみ <input type="checkbox"/> 追記欄に記載した指定国	
<input checked="" type="checkbox"/> その他の出願人又は発明者が他の続表に記載されている。	

第Ⅲ欄の続き その他の出願人又は発明者	
この続表を使用しないときは、この用紙を願書に含めないこと。	
氏名(名称)及びあて名:(姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載) 八重島 智子 YAESHIMA Tomoko 〒228-0004 日本国神奈川県座間市東原五丁目1番83号 森永乳業株式会社 栄養科学研究所内 c/o MORINAGA MILK INDUSTRY CO., LTD., Nutritional Science Laboratory, 1-83, Higashihara 5-chome, Zama-shi, Kanagawa 228-0004 Japan	この欄に記載した者は次に該当する: <input type="checkbox"/> 出願人のみである。 <input checked="" type="checkbox"/> 出願人及び発明者である。 <input type="checkbox"/> 発明者のみである。 (ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと) 出願人登録番号:
国籍(国名): 日本国 JAPAN	住所(国名): 日本国 JAPAN
この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である: <input type="checkbox"/> すべての指定国 <input type="checkbox"/> 米国を除くすべての指定国 <input checked="" type="checkbox"/> 米国のみ <input type="checkbox"/> 追記欄に記載した指定国	
氏名(名称)及びあて名:(姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載) 高橋 幸子 TAKAHASHI Sachiko 〒228-0004 日本国神奈川県座間市東原五丁目1番83号 森永乳業株式会社 栄養科学研究所内 c/o MORINAGA MILK INDUSTRY CO., LTD., Nutritional Science Laboratory, 1-83, Higashihara 5-chome, Zama-shi, Kanagawa 228-0004 Japan	この欄に記載した者は次に該当する: <input type="checkbox"/> 出願人のみである。 <input checked="" type="checkbox"/> 出願人及び発明者である。 <input type="checkbox"/> 発明者のみである。 (ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと) 出願人登録番号:
国籍(国名): 日本国 JAPAN	住所(国名): 日本国 JAPAN
この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である: <input type="checkbox"/> すべての指定国 <input type="checkbox"/> 米国を除くすべての指定国 <input checked="" type="checkbox"/> 米国のみ <input type="checkbox"/> 追記欄に記載した指定国	
氏名(名称)及びあて名:(姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)	この欄に記載した者は次に該当する: <input type="checkbox"/> 出願人のみである。 <input type="checkbox"/> 出願人及び発明者である。 <input type="checkbox"/> 発明者のみである。 (ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと) 出願人登録番号:
国籍(国名):	住所(国名):
この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である: <input type="checkbox"/> すべての指定国 <input type="checkbox"/> 米国を除くすべての指定国 <input type="checkbox"/> 米国のみ <input type="checkbox"/> 追記欄に記載した指定国	
氏名(名称)及びあて名:(姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)	この欄に記載した者は次に該当する: <input type="checkbox"/> 出願人のみである。 <input type="checkbox"/> 出願人及び発明者である。 <input type="checkbox"/> 発明者のみである。 (ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと) 出願人登録番号:
国籍(国名):	住所(国名):
この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である: <input type="checkbox"/> すべての指定国 <input type="checkbox"/> 米国を除くすべての指定国 <input type="checkbox"/> 米国のみ <input type="checkbox"/> 追記欄に記載した指定国	
<input type="checkbox"/> その他の出願人又は発明者が他の続表に記載されている。	

第V欄 国の指定

(該当する□にレ印を付すこと：少なくとも1つの□にレ印を付すこと)。

規則 4.9(a)の規定に基づき次の指定を行う。ほかの種類保護又は取扱をいずれかの指定国(又はOAPI)で求める場合には追記欄に記載する。

広域特許

- ☐ A P A R I P O 特許：G H ガーナ Ghana, G M ガンビア Gambia, K E ケニア Kenya, L S レソト Lesotho, M W マラウイ Malawi, M Z モザンビーク Mozambique, S D スーダン Sudan, S L シェラ・レオネ Sierra Leone, S Z スワジランド Swaziland, T Z タンザニア United Republic of Tanzania, U G ウガンダ Uganda, Z M ザンビア Zambia, Z W ジンバブエ Zimbabwe, 及びハラレプロトコルと特許協力条約の締約国である他の国 (他の種類の保護又は取り扱いを求める場合には点線上に記載する).....
- ☐ E A ユーラシア特許：A M アルメニア Armenia, A Z アゼルバイジャン Azerbaijan, B Y ベラルーシ Belarus, K G キルギスタン Kyrgyzstan, K Z カザフスタン Kazakhstan, M D モルドヴァ Republic of Moldova, R U ロシア Russian Federation, T J タジキスタン Tajikistan, T M トルクメニスタン Turkmenistan, 及びユーラシア特許条約と特許協力条約の締約国である他の国.....
- ☒ E P ヨーロッパ特許：A T オーストリア Austria, B E ベルギー Belgium, B G ブルガリア Bulgaria, C H and L I スイス及びリヒテンシュタイン Switzerland and Liechtenstein, C Y キプロス Cyprus, C Z チェコ Czech Republic, D E ドイツ Germany, D K デンマーク Denmark, E E エストニア Estonia, E S スペイン Spain, F I フィンランド Finland, F R フランス France, G B 英国 United Kingdom, G R ギリシャ Greece, I E アイルランド Ireland, I T イタリア Italy, L U ルクセンブルグ Luxembourg, M C モナコ Monaco, N L オランダ Netherlands, P T ポルトガル Portugal, S E スウェーデン Sweden, S K スロヴァキア Slovakia, T R トルコ Turkey, 及びヨーロッパ特許条約と特許協力条約の締約国である他の国.....
- ☐ O A O A P I 特許：B F ブルキナ・ファソ Burkina Faso, B J ベナン Benin, C F 中央アフリカ Central African Republic, C G コンゴ Congo, C I コートジボアール Côte d'Ivoire, C M カメルーン Cameroon, G A ガボン Gabon, G N ギニア Guinea, G Q 赤道ギニア Equatorial Guinea, G W ギニア・ビサウ Guinea-Bissau, M L マリ Mali, M R モーリタニア Mauritania, N E ニジェール Niger, S N セネガル Senegal, T D チャド Chad, T G トーゴ Togo, 及びアフリカ知的財産機構のメンバー国であり特許協力条約の締約国である他の国 (他の種類の保護又は取り扱いを求める場合には点線上に記載する).....

国内特許 (他の種類の保護又は取り扱いを求める場合には点線上に記載する)

- | | | |
|--|---|---|
| <input type="checkbox"/> A E アラブ首長国連邦
United Arab Emirates | <input type="checkbox"/> G E グルジア Georgia..... | <input type="checkbox"/> N Z ニュー・ジーランド New Zealand
..... |
| <input type="checkbox"/> A G アンティグア・バーブダ
Antigua and Barbuda | <input type="checkbox"/> G H ガーナ Ghana | <input type="checkbox"/> O M オマーン Oman |
| <input type="checkbox"/> A L アルバニア Albania | <input type="checkbox"/> G M ガンビア Gambia | <input type="checkbox"/> P H フィリピン Philippines..... |
| <input type="checkbox"/> A M アルメニア Armenia..... | <input type="checkbox"/> H R クロアチア Croatia | <input type="checkbox"/> P L ポーランド Poland..... |
| <input type="checkbox"/> A T オーストリア Austria..... | <input type="checkbox"/> H U ハンガリー Hungary..... | <input type="checkbox"/> P T ポルトガル Portugal..... |
| <input type="checkbox"/> A U オーストラリア Australia..... | <input type="checkbox"/> I D インドネシア Indonesia | <input type="checkbox"/> R O ルーマニア Romania |
| <input type="checkbox"/> A Z アゼルバイジャン Azerbaijan | <input type="checkbox"/> I L イスラエル Israel..... | <input type="checkbox"/> R U ロシア Russian Federation |
| <input type="checkbox"/> B A ボスニア・ヘルツェゴヴィナ Bosnia
and Herzegovina..... | <input type="checkbox"/> I N インド India..... | <input type="checkbox"/> S D スーダン Sudan |
| <input type="checkbox"/> B B バルバドス Barbados | <input type="checkbox"/> I S アイスランド Iceland | <input type="checkbox"/> S E スウェーデン Sweden |
| <input type="checkbox"/> B G ブルガリア Bulgaria..... | <input checked="" type="checkbox"/> J P 日本 Japan..... | <input type="checkbox"/> S G シンガポール Singapore |
| <input type="checkbox"/> B R ブラジル Brazil..... | <input type="checkbox"/> K E ケニア Kenya | <input type="checkbox"/> S I スロヴェニア Slovenia..... |
| <input type="checkbox"/> B Y ベラルーシ Belarus | <input type="checkbox"/> K G キルギスタン Kyrgyzstan..... | <input type="checkbox"/> S K スロヴァキア Slovakia..... |
| <input type="checkbox"/> B Z ベリーズ Belize..... | <input type="checkbox"/> K P 北朝鮮..... | <input type="checkbox"/> S L シェラ・レオネ Sierra Leone |
| <input type="checkbox"/> C A カナダ Canada | Democratic People's Republic of Korea | <input type="checkbox"/> T J タジキスタン Tajikistan |
| <input type="checkbox"/> C H and L I スイス及びリヒテンシュタイン
Switzerland and Liechtenstein | <input type="checkbox"/> K R 韓国 Republic of Korea..... | <input type="checkbox"/> T M トルクメニスタン Turkmenistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> C N 中国 China..... | <input type="checkbox"/> K Z カザフスタン Kazakhstan..... | <input type="checkbox"/> T N テュニジア Tunisia |
| <input type="checkbox"/> C O コロンビア Colombia | <input type="checkbox"/> L C セント・ルシア Saint Lucia..... | <input type="checkbox"/> T R トルコ Turkey..... |
| <input type="checkbox"/> C R コスタリカ Costa Rica..... | <input type="checkbox"/> L K スリ・ランカ Sri Lanka | <input type="checkbox"/> T T トリニダード・トバゴ
Trinidad and Tobago |
| <input type="checkbox"/> C U キューバ Cuba..... | <input type="checkbox"/> L R リベリア Liberia | <input type="checkbox"/> T Z タンザニア
United Republic of Tanzania |
| <input type="checkbox"/> C Z チェコ Czech Republic..... | <input type="checkbox"/> L S レソト Lesotho..... | <input type="checkbox"/> U A ウクライナ Ukraine..... |
| <input type="checkbox"/> D E ドイツ Germany..... | <input type="checkbox"/> L T リトアニア Lithuania | <input type="checkbox"/> U G ウガンダ Uganda..... |
| <input type="checkbox"/> D K デンマーク Denmark..... | <input type="checkbox"/> L U ルクセンブルグ Luxembourg | <input checked="" type="checkbox"/> U S 米国 United States of America |
| <input type="checkbox"/> D M ドミニカ Dominica | <input type="checkbox"/> L V ラトヴィア Latvia | <input type="checkbox"/> U Z ウズベキスタン Uzbekistan..... |
| <input type="checkbox"/> D Z アルジェリア Algeria..... | <input type="checkbox"/> M A モロッコ Morocco..... | <input type="checkbox"/> V N ベトナム Viet Nam |
| <input type="checkbox"/> E C エクアドル Ecuador..... | <input type="checkbox"/> M D モルドヴァ Republic of Moldova | <input type="checkbox"/> Y U ユーゴスラヴィア Yugoslavia..... |
| <input type="checkbox"/> E E エストニア Estonia..... | <input type="checkbox"/> M G マダガスカル Madagascar | <input type="checkbox"/> Z A 南アフリカ共和国 South Africa |
| <input type="checkbox"/> E S スペイン Spain..... | <input type="checkbox"/> M K マケドニア旧ユーゴスラヴィア
共和国 The former Yugoslav Republic of
Macedonia | <input type="checkbox"/> Z M ザンビア Zambia |
| <input type="checkbox"/> F I フィンランド Finland..... | <input type="checkbox"/> M N モンゴル Mongolia | <input type="checkbox"/> Z W ジンバブエ Zimbabwe..... |
| <input type="checkbox"/> G B 英国 United Kingdom | <input type="checkbox"/> M W マラウイ Malawi..... | |
| <input type="checkbox"/> G D グレナダ Grenada | <input type="checkbox"/> M X メキシコ Mexico..... | |
| | <input type="checkbox"/> M Z モザンビーク Mozambique | |
| | <input type="checkbox"/> N O ノルウェー Norway | |

以下の□は、この様式の施行後に特許協力条約の締約国となった国を指定するためのものである。

指定の確認の宣言：出願人は、上記の指定に加えて、規則 4.9(h)の規定に基づき、特許協力条約の下で認められる他の全ての国の指定を行う。但し、追記欄にこの宣言から除外の表示をした国は、指定から除かれる。出願人は、これらの追加される指定が確認を条件としていること、並びに優先日から15月が経過する前にその確認がなされない指定は、この期間の経過時に、出願人によって取り下げられたものとみなされることを宣言する。(指定の確認は、指定を特定する通知の提出と指定手数料及び確認手数料の納付からなる。この確認は、優先日から15月以内に受理官庁へ提出しなければならない。)

VI欄 優先権主張

以下の先の出願に基づく優先権を主張する：

先の出願日 (日、月、年)	先の出願番号	先の出願		
		国内出願：国名	広域出願：*広域官庁名	国際出願：受理官庁名
(1) 07. 12. 01	特願2001- 374327	日本国 JAPAN		
(2)				
(3)				
(4)				
(5)				

☐ 他の優先権の主張（先の出願）が追記欄に記載されている。

上記の先の出願（ただし、本国際出願の受理官庁に対して出願されたものに限る）のうち、以下のものについて、出願書類の認証謄本を作成し国際事務局へ送付することを、受理官庁（日本国特許庁の長官）に対して請求する

☒ すべて ☐ 優先権(1) ☐ 優先権(2) ☐ 優先権(3) ☐ 優先権(4) ☐ 優先権(5) ☐ その他は追記欄参照

*先の出願がARIPO出願である場合には、当該先の出願を行った工業所有権の保護のためのパリ条約同盟国若しくは世界貿易機関の加盟国の少なくとも1ヶ国を表示しなければならない（規則4.10(b)(ii)）：.....

第VII欄 国際調査機関

国際調査機関（ISA）の選択（2以上の国際調査機関が国際調査を実施することが可能な場合、いずれかを選択し二文字コードを記載。）

ISA / JP

先の調査結果の利用請求；当該調査の照会（先の調査が、国際調査機関によって既に実施又は請求されている場合）

出願日（日、月、年）

出願番号

国名（又は広域官庁名）

第VIII欄 申立て

この出願は以下の申立てを含む。（下記の該当する欄をチェックし、右にそれぞれの申立て数を記載）

申立て数

- | | | | |
|--------------------------------------|-------------------------------------|---|-------|
| <input type="checkbox"/> 第VIII欄(i) | 発明者の特定に関する申立て | : | _____ |
| <input type="checkbox"/> 第VIII欄(ii) | 出願し及び特許を与えられる国際出願日における出願人の資格に関する申立て | : | _____ |
| <input type="checkbox"/> 第VIII欄(iii) | 先の出願の優先権を主張する国際出願日における出願人の資格に関する申立て | : | _____ |
| <input type="checkbox"/> 第VIII欄(iv) | 発明者である旨の申立て
(米国を指定国とする場合) | : | _____ |
| <input type="checkbox"/> 第VIII欄(v) | 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て | : | _____ |

Ⅹ欄 照合欄：出願の言語

この国際出願の紙様式の枚数は次のとおりである。
紙形式での枚数

願書（申立てを含む）	6 枚
明細書（配列表を除く）	16 枚
請求の範囲	1 枚
要約書	1 枚
図面	枚
小計	24 枚
明細書の配列表部分 (紙形式での出願の場合はその枚数 コンピュータ読み取り可能な形式の有無を問わない。 下記(b)参照)	枚
合 計	24 枚

(b)コンピュータ読み取り可能な形式による配列表部分

(i) ☐ コンピュータ読み取り可能な形式のみ
(実施細則第 801 号(a)(i))

(ii) ☐ 紙形式に追加
(実施細則第 801 号(a)(ii))

配列表部分を含む媒体の種類（フレキシブルディスク、CD-ROM、CD-R その他）と枚数
(追加的写しは右欄 9. (ii)に記載)

この国際出願には、以下にチェックしたものが添付されている。

1. <input checked="" type="checkbox"/> 手数料計算用紙	数
<input checked="" type="checkbox"/> 納付する手数料に相当する特許印紙を貼付した書面	1
<input type="checkbox"/> 国際事務局の口座への振込を証明する書面	1
2. <input checked="" type="checkbox"/> 個別の委任状の原本	3
3. <input type="checkbox"/> 包括委任状の原本	
4. <input type="checkbox"/> 包括委任状の写し（あれば包括委任状番号）	
5. <input type="checkbox"/> 記名押印（署名）の欠落についての説明書	
6. <input type="checkbox"/> 優先権書類（上記第Ⅵ欄の（ ）の番号を記載する）：	
7. <input type="checkbox"/> 国際出願の翻訳文（翻訳に使用した言語名を記載する）：	
8. <input checked="" type="checkbox"/> 寄託した微生物又は他の生物材料に関する書面	1
9. <input type="checkbox"/> コンピュータ読み取り可能なスクレオチド又はアミノ酸配列表 (媒体の種類（フレキシブルディスク、CD-ROM、CD-R その他）と枚数も表示する)	
(i) <input type="checkbox"/> 規則 13 の 3 に基づき提出する国際調査のための写し (国際出願の一部を構成しない)	
(ii) <input type="checkbox"/> (左欄(b)(i)又は(b)(ii)にレ印を付した場合のみ) 規則 13 の 3 に基づき提出する国際調査のための写しを含む追加的写し 国際調査のための写しの同一性、又は左欄に記載した 配列表部分を含む写しの同一性についての陳述書を添付	
(iii) <input type="checkbox"/> その他（書類名を具体的に記載）：	

要約書とともに提示する図面：

本国際出願の言語：日本語

第Ⅹ欄 出願人、代理人又は代表者の記名押印

各人の氏名（名称）を記載し、その次に押印する。

志賀 正武 渡邊 隆



受理官庁記入欄

1. 国際出願として提出された書類の実際の受理の日

3. 国際出願として提出された書類を補完する書面又は図面であって
その後期間内に受理されたものの実際の受理の日（訂正日）

4. 特許協力条約第 11 条（2）に基づく必要な補完の期間内の受理の日

5. 出願人により特定された
国際調査機関

ISA/JP

6. ☐ 調査手数料未払いにつき、国際調査機関に
調査用写しを送付していない。

2. 図面

☐ 受理された

☐ 不足図面がある

21.11.02

国際事務局記入欄

記録原本の受理の日：

ビフィドバクテリウム・ロンガム

技術分野

本発明は、発酵性や、酸性条件下、流通過程での保存性に優れ、さらに胃酸耐性能に優れ、生理機能を発揮し易い新規なビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*) に関する。

また、本発明は、かかるビフィドバクテリウム・ロンガムを含有する新規なビフィドバクテリウム・ロンガムの菌末及び飲食品に関する。

背景技術

ビフィドバクテリウム・ロンガム等のビフィドバクテリウム属菌（以下、「ビフィズス菌」という）は、ヒトの腸管内で形成される腸内菌叢の優勢菌種の一つであって、その摂取により整腸作用を有することが知られている。近年、生活者の健康志向の高まりと共に、ビフィズス菌を含む食品への需要も高まっており、発酵乳や乳酸菌飲料等に広くビフィズス菌が利用されている。また、抗腫瘍活性等、ビフィズス菌の有する生理作用についても、種々報告がなされており、各種健康食品への利用が試みられている。このように、腸内菌叢の維持や改善等、ビフィズス菌の効果が期待されているが、このような効果をビフィズス菌に発揮させるためには、ビフィズス菌を継続的に摂取することが必要とされている。

しかし、ビフィズス菌は、乳性成分培地における増殖性が良くなく、一定の pH 及び菌数に到達するまで長時間の発酵を要する。また、ビフィズス菌は、酸性条件下での保存が難しく、死滅し易いため、ビフィズス菌を用いた発酵乳製品は、流通過程で菌数の維持が大きな課題である。

一方、ビフィズス菌の生理作用の発揮には生きている菌がもっとも効果的であるとされているが、ヒト消化管内には、乳酸菌やビフィズス菌にとって様々な死滅要因や生育阻害要因が存在している。特に、消化管の最初の関門である胃に到達した時に、胃液の低い pH 及び消化酵素の洗礼を受けなければならない。胃

内の内容物などの状況によるが、一般的に pH 3.0 で 2 時間生きることが胃酸耐性能の 1 つの基準とされている（伊藤ら、日畜会報、63 巻、12 号、1276-1289 頁、1992 年）。

しかし、ビフィズス菌の殆どは、低い pH に弱く、乳酸桿菌などに較べて胃液を通過する確率が低いとされている。

したがって、ビフィズス菌を含有する飲食品を開発するに際しては、短時間で一定量以上増殖させることができ（発酵性）、製造後の流通及び消費の過程で一定量以上の生菌数を維持でき（耐酸性）、さらに胃酸耐性能を有し、生きたまま消化管（特に腸管）に到達して生理作用を発揮し得るビフィズス菌の開発が望まれている。

このような点から、ビフィズス菌の発酵性、耐酸性及び胃酸耐性能の研究がなされている。例えば、ビフィドバクテリウム・ビフィダム(*Bifidobacterium bifidum*) について、耐酸性や乳性培地中での発酵性を有する変異株が存在することが知られている（特公昭 56-42250 号公報）。また、ビフィドバクテリウム・ロンガムについて耐酸性を有する菌株が知られている（特公昭 59-53829 号公報（以下引用文献 1 と記載する）、特開平 11-75830 号公報）。さらに、ビフィドバクテリウム・ブレーベ(*Bifidobacterium breve*) が還元脱脂乳培地中で増殖し、さらに耐酸性を有することが知られている（特開平 4-320642 号公報）。

しかし、前記既報のビフィドバクテリウム・ビフィダム及びビフィドバクテリウム・ブレーベは、乳性培地中で所定 pH まで発酵するには 15 時間以上の長時間を要する。また、耐酸性菌株の多くも、酸性乳製品又は果汁製品中（pH 4.0~4.8）において冷蔵保管した生残率は、必ずしも十分満足できるものとはいえない。即ち、前記菌株は耐酸性が十分ではなかった。また、消化管（腸管）内での生残性に関係があるとされている胃酸耐性能の強いビフィドバクテリウム・ロンガムの変異株の報告もあるが（特開平 9-322762 号公報、以下引用文献 2 と記載する）、この菌株は後記する試験の結果等からも明らかであるように、酸性乳製品中での保存性が十分ではなかった。

したがって、本発明は、乳性培地中で増殖性がよく、耐酸性を有し、発酵乳製

品中で一定数以上の菌数が確保しやすく、また保存流通中でも菌数の維持ができ、かつ胃酸耐性能が強く、生きて消化管（腸管）まで到達し、生理機能を発揮しやすいビフィズス菌を提供することを目的とする。

また、本発明は、かかるビフィズス菌を含有する菌末及び飲食品を提供することを目的とする。

発明の開示

本発明者らは、上記目的を達成すべく鋭意研究した結果、（１）乳性培地を pH 4.6 以下にする発酵性、（２）乳性培地で pH 4.4～4.6 に達した時に急冷して 10℃、2 週間保持した時の生残率が 50% 以上である、（３）pH 3.0 の人工胃液で 37℃ 2 時間保温した時の生残率が 10% 以上である胃酸耐性能、を有するビフィドバクテリウム・ロンガムであれば、短時間で一定量以上増殖させることができ、製造後の流通及び消費の過程で一定量以上の生菌数を維持でき、さらに胃酸耐性能を有し、生きたまま消化管（特に腸管）に到達して生理作用を発揮し得ることを見出し、本発明を完成した。

すなわち、本発明は、下記の菌学的性質を有するビフィドバクテリウム・ロンガムを提供するものである。

- （１）乳性培地を pH 4.6 以下にする発酵性、
- （２）乳性培地で pH 4.4～4.6 に達した時に急冷して 10℃、2 週間保持した時の生残率が 50% 以上である、
- （３）pH 3.0 の人工胃液で 37℃ で 2 時間保温した時の生残率が 10% 以上である胃酸耐性能。

また、本発明は、かかるビフィドバクテリウム・ロンガムを含有する菌末を提供するものである。

また、本発明は、かかるビフィドバクテリウム・ロンガムを含有する飲食品を提供するものである。

発明を実施するための最良の形態

本発明のビフィドバクテリウム・ロンガムは、上記（１）、（２）、（３）の特性

を有するものである。

(1) は、発酵性に関するものである。ビフィズス菌は、一般に乳性成分培地における増殖性が弱く、一定の pH、菌数に到達するまで長時間の発酵が必要である。乳性培地にて、pH を 4.6 以下にすることができる強い発酵力を有する菌であれば、発酵を短時間で行うことができ、これを用いた飲食品（発酵乳製品等の酸性乳製品、果汁製品等）中で一定菌数（例えば発酵乳製品 1 ml 当たり 1000 万個）を容易に確保することができ、製造効率が向上する。

(2) は、ビフィズス菌を用いた発酵乳製品の保存中又は流通中において、一定の菌数を維持できる耐酸性に関するものである。一般に、酸性乳製品又は果汁製品の pH は、4.0～4.8 であり、その品質保持期限は、10℃以下の保存条件で、2週間程度であることが一般的である。本発明者らは、乳性培地を用いて培養し、pH 4.4～4.6 に達した時に急冷して 10℃、2週間保持した時の生残率が 50%以上ある菌であれば、耐酸性が強く、品質保持期限内の酸性乳製品等において、一定の生菌数を確保することができることを見出した。これに対して、例えば pH 4 のクエン酸やリンゴ酸緩衝液中で、10℃、4日間保存したときの残存率が 5%以上の菌では、かならずしも十分な耐酸性を有するとはいえない。なお、乳性培地とは、牛乳、生クリーム、バター、脱脂乳等の乳成分を培地とし、乳蛋白質を 3%以上含有した培地をいう。

(3) は、ビフィズス菌が生きて消化管（腸管）に到達するための胃酸耐性能に関するものである。ビフィズス菌は、経口摂取後、胃を通過した後、腸管に達してその生理機能を発揮する。しかし、胃酸は pH が低いため、胃中で大部分の菌は死滅してしまい、腸管に到達できる菌は少ない。pH 3.0 の人工胃液で 37℃ 2時間保温した時の生残率が 10%以上であれば、胃酸耐性能が高く、多くの菌が生きて腸管に到達することができると考えられる。

上記 (1)～(3) の菌学的性質を有するビフィドバクテリウム・ロンガムを摂取することにより、多くの菌が生きて腸管に到達することができ、ビフィズス菌としての生理機能が発揮され易い。

本発明のビフィドバクテリウム・ロンガムは、例えば以下の方法により得ることができる。まず、各種の試料から菌株を分離し、この中から乳性培地での発酵

性が優れたもの、すなわち乳性培地をpH 4.6以下にする発酵性を有するものを選択する。次いで、選択された菌をスターターとして発酵乳製品を調製し、低温保存中で生残性の優れた菌株、すなわち乳性培地を用いて培養し、pH 4.4～4.6に達した時に急冷して10℃、2週間保持した時の生残率が50%以上である菌株を選出する。さらに、かかる菌株をpH 3.0の人工胃液で37℃2時間保温し、生残率が10%以上である胃酸耐性能の優れた菌株を選択することにより得ることができる。

以下、さらに詳細に説明する。

1. 菌株の取得

本発明者らは、前記の性質を有する菌株を自然界から取得すべく、自然界から採集したサンプルを嫌気性希釈液（1980年叢文社発行、光岡知足著「腸内菌の世界」322ページ。以下、参考文献1と記載する。）で希釈し、BL寒天培地（前記参考文献1、319ページ）の平板に塗布し、37℃で嫌気培養した。そして得られたコロニーの中でビフィズス菌特有の形態を示し、かつ塗布標本の顕微鏡観察によりグラム陽性であり、棒状、棍棒状又は分岐状の菌形を示す菌を釣菌しBL寒天平板に画線塗布し、前記と同様の方法で嫌気培養を反復し、純粹単離された菌株を得た。これらの菌株を下記の試験方法を用いて、まず発酵試験及び保存中での生残性試験を行ない、それらに優れた性質をもつ菌株を20株あまり得た。続いて、胃酸耐性試験を行ない、pH 3.0の人工胃液中で優れた生残性を示した株を取得した。そのなかで、最も優れた菌株を、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターにFERM BP-7787（寄託日：平成13年10月31日）として寄託した。該菌株の菌学的性質を以下に示す。

2. 菌学的性質

(1) 菌形（BL寒天培地で37℃、72時間嫌気培養したときの光学顕微鏡観察時）

大きさ：0.3～0.8 μm × 4～10 μm

形状：多形性を示す桿菌（こん棒状、Y字状等）

(2) グラム染色性：陽性

(3) コロニー形態 (BL寒天培地で37℃、72時間嫌気培養したとき)

形状：円形隆起～半球状に隆起

周縁：円滑

大きさ：1～4 mm

色調：周縁暗褐色、中心濃褐色

表面：円滑

(4) 芽胞形成：陰性

(5) ガス生成：なし

(6) 運動性：なし

(7) カタラーゼ活性：陰性

(8) 酢酸/L (+) 乳酸モル比：1.5以上

(9) 糖の発酵性 光岡の糖発酵性用培地 (前記参考文献1、323ページ) を用いてAPI 50CHシステム (日本バイオメリュー株式会社) により実施した。

L-アラビノース、D-キシロース、ガラクトース、D-グルコース、D-フラクトース、D-マンノース、マルトース、ラクトース、メリビオース、シュークロース、メレチトース、ラフィノース、D-ツラノースは陽性； α -メチルグルコシドは遅れて陽性；

グリセロール、エリスリトール、D-アラビノース、リボース、L-キシロース、アドニット、メチリキシロシド、L-ソルボース、ラムノース、ダルシット、イノシット、マンニット、ソルビット、 α -メチルマンノシド、N-アセチルグルコサミン、アミグタリン、アルブチン、エスクリン、サリシン、セロビオース、トレハロース、イヌリン、スターチ、グリコーゲン、キシリトール、ゲンチオビオース、D-リキソース、D-タガトース、D-フコース、L-フコース、D-アラビトール、L-アラビトール、グルコネート、2-ケトグルコネート、5-ケトグルコネートは陰性。

(10) DNAの相同性

ビフィドバクテリウム・ロンガムATCC 15707^T及びビフィドバクテ

リウム・アニマリス(*Bifidobacterium animalis*) R 1 0 1 - 8 ^T (理化学研究所微生物系統保存施設にて J C M 1 1 9 0 ^T として入手可能。) の染色体 DNA をそれぞれ抽出し、ビフィドバクテリウム・ロンガム F E R M B P - 7 7 8 7 から抽出した染色体 DNA とマイクロプレートハブリダイゼーション法によりハイブリダイゼーションを行った。ビフィドバクテリウム・ロンガム F E R M B P - 7 7 8 7 から抽出した染色体 DNA は、ビフィドバクテリウム・ロンガム A T C C

1 5 7 0 7 から抽出した染色体 DNA に対して 9 5 % の相同性を示し、ビフィドバクテリウム・アニマリス R 1 0 1 - 8 ^T との相同性は 2 2 % であった。

以上、本発明のビフィドバクテリウム・ロンガム F E R M B P - 7 7 8 7 は、Bergey's Manual of Systematic Bacteriology、v o l . 2 , 1 9 8 6 の分類基準に示されるビフィズス菌と合致しており、また、糖発酵性、性状及び DNA の相同性の結果によりビフィドバクテリウム・ロンガムであると同定された。

3. 乳性培地での発酵性

0. 2 % 酵母エキス (Difco 社製) を配合した 1 1 % 還元脱脂粉乳培地を 1 1 5 °C、1 5 分で滅菌し、同培地で 2 回継代培養したビフィドバクテリウム・ロンガム F E R M B P - 7 7 8 7 及び対照株 (表 1 に記載されている本発明菌以外の菌株) のスターターを 5 % 接種し、3 7 °C で 6 時間培養した。培養液の p H 及び菌数を測定した。菌数測定は R C A (Reinforced Clostridial Agar, Oxoid 社製) 平板で行なった。本培養条件で、ビフィドバクテリウム・ロンガム F E R M

B P - 7 7 8 7 は、対照株に比較して、短時間で乳性培地を凝固させることができ、ビフィズス菌数も最も高かった (表 1)。

[表 1]

各菌株の乳性培地における発酵性

菌 株	pH	CFU/ml
ビフィドバクテリウム・ロンガム FERM BP-7787(本発明菌)	4.56	2.1×10^9
ビフィドバクテリウム・ロンガム FERM P-6548	5.02	7.3×10^8
ビフィドバクテリウム・ロンガム ATCC15707	5.88	1.9×10^8
ビフィドバクテリウム・ロンガム ATCC15708	5.82	9.3×10^7
ビフィドバクテリウム・ロンガム ATCC55817	5.64	4.7×10^8

ビフィドバクテリウム・ロンガム FERM P-6548 :引用文献1記載菌株

ビフィドバクテリウム・ロンガム ATCC55817 :引用文献2記載菌株

4. 耐酸性

(1) 単独発酵

前記0. 2%酵母エキス (Difco 社製) を配合した11%還元脱脂粉乳培地をガラス試験管に入れ、115℃、15分滅菌し、ビフィドバクテリウム・ロンガム FERM BP-7787及び対照株(表2において本菌株以外の菌株)のスターターを5%接種し、37℃でpHが4.3~4.4になるまで発酵させた後、急冷し、10℃で保存試験を行なった。急冷直後、保存1週間後及び2週間後の菌数をRCA寒天平板で測定し、各期間保存後における生残率を算出した。

ビフィドバクテリウム・ロンガム FERM BP-7787は、pH4.4まで発酵した培地において、10℃で2週間保存しても殆ど生き残っており、非常に高い生残性を示し、対照株ビフィドバクテリウム・ロンガム FERM P-6548に比べて優れている(表2)。胃酸耐性能を有することが知られているビフィドバクテリウム・ロンガム ATCC 55817及び他の対照株は2週間保存後殆ど生き残っていなかった。

[表 2]

各菌株の乳性培地における生残性

菌 株	急冷直後			保存 1 週間			保存 2 週間		
	発酵時間	pH	菌 数 /ml	pH	菌 数 /ml	生残率 (%)	pH	菌 数 /ml	生残率 (%)
ビフイトバクテリウム・ロンガム FERM BP-7787(本発明菌)	7.0	4.40	1.8×10^9	4.31	1.9×10^9	105.5	4.30	1.7×10^9	92.1
ビフイトバクテリウム・ロンガム FERM P-6548	14.0	4.44	1.5×10^9	4.38	1.2×10^9	80.4	4.35	7.5×10^8	50.1
ビフイトバクテリウム・ロンガム ATCC15707	14.5	4.42	2.2×10^9	4.37	6.0×10^7	1.8	4.33	2.0×10^7	0.56
ビフイトバクテリウム・ロンガム ATCC15708	14.0	4.41	1.0×10^9	4.40	1.0×10^8	10.1	4.40	6.0×10^5	0.06
ビフイトバクテリウム・ロンガム ATCC55817	14.0	4.38	1.9×10^9	4.35	7.0×10^7	2.8	4.34	1.5×10^5	0.01

ビフイトバクテリウム・ロンガム FERM P-6548:引用文献1記載菌株

ビフイトバクテリウム・ロンガム ATCC55817:引用文献2記載菌株

(2) 混合発酵

後記実施例1と同様組成の乳脂肪3.0% (W/W)、無脂乳固形分9% (W/W) からなる生乳ベースを、70℃に加温し、15MPaの圧力で均質し、90℃で10分間殺菌し、40℃に冷却した。この殺菌したベースに、後記実施例1記載の方法で調製したストレプトコッカス・サーモフィルス (*Streptococcus thermophilus*) とラクトバチルス・デルブリュッキイ・サブスピシーズ・ブルガリクス (*Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*) の混合カルチャー0.6%を接種した。さらに、前記0.2%酵母エキス (Difco 社製) を配合した11%還元脱脂粉乳培地で、37℃でpHが4.3~4.4になるまで培養したビフィドバクテリウム・ロンガム FERM BP-7787 及び対照株 (表3において本発明菌以外の菌株) のスターターをそれぞれ5%接種し、試験管に分注し、37℃で5時間培養し、急冷し10℃で保存試験を行なった。急冷直後、保存1週間後及び2週間後の菌数をRCA寒天平板で測定し、保存における生残率を算出した。ビフィドバクテリウム・ロンガム FERM BP-7787 は、pH4.6以下まで発酵した発酵乳において、10℃で2週間保存しても50%以上が生き残っており、胃酸耐性能を有していることが知られているビフィドバクテリウム・ロンガム ATCC 55817 及び他の対照株に比べて耐酸性がすぐれている (表3)。

[表 3]

各菌株の乳性培地における生存性

菌 株	急冷直後		保存 1 週間			保存 2 週間		
	pH	菌 数 /ml	pH	菌 数 /ml	生存率 (%)	pH	菌 数 /ml	生存率 (%)
ビフイトバクテリウム・ロンガム FERM BP-7787(本発明菌)	4.59	3.3×10^8	4.20	2.5×10^8	75.8	4.18	1.7×10^8	51.5
ビフイトバクテリウム・ロンガム FERM P-6548	4.57	2.5×10^8	4.23	8.0×10^7	32.1	4.18	7.5×10^7	30.0
ビフイトバクテリウム・ロンガム ATCC15707	4.60	2.1×10^8	4.26	2.5×10^6	1.20	4.17	2.0×10^3	<0.001
ビフイトバクテリウム・ロンガム ATCC15708	4.63	1.7×10^8	4.27	$<1.0 \times 10^4$	<0.01	4.18	$<1.0 \times 10^3$	<0.001
ビフイトバクテリウム・ロンガム ATCC55817	4.54	2.2×10^8	4.28	7.1×10^6	3.20	4.16	$<1.0 \times 10^3$	<0.001

ビフイトバクテリウム・ロンガム FERM P-6548:引用文献1記載菌株

ビフイトバクテリウム・ロンガム ATCC55817:引用文献2記載菌株

5. 胃酸耐性

胃酸耐性試験は以下の通りに実施した。すなわち、ろ過滅菌した 1 M 塩酸で pH 3. 0 に調製した人工胃液〔0. 2 % NaCl、0. 35 % ペプシン (1 : 5000) を精製水で溶解〕9. 9 ml に、Briggs liver broth (光岡知足 ; 臨床検査、18 巻、1163 ~ 1172 ページ、1974 年) で 2 回賦活培養 (37 °C、24 時間) し、生理食塩水で 1 回洗浄したビフィドバクテリウム・ロンガム FERM BP-7787 及び対照株の菌体懸濁液 0. 1 ml を添加した。37 °C で 2 時間接触後、1 ml を pH 6. 5 のリン酸緩衝液 (67 mM) 9 ml に添加し処理を停止させた。次に、初発菌数及び人工胃液に接触後の菌数を RCA 寒天平板を用いて計測し、生残率を算出した。本法により本発明の FERM BP-7787 株は ATCC 55817 株と同レベルで高い胃酸耐性能を示し、他の菌株は、比較的耐酸性を有する FERM P-6548 を含めて殆ど耐性を示さなかった (表 4)。

[表 4]

各菌株の人工胃液耐性

菌 株	初菌数(CFU/ml)	2 時間処理後の生残率 (%)
ビフィドバクテリウム・ロンガム FERM BP-7787(本発明菌)	5.1×10^8	23.5
ビフィドバクテリウム・ロンガム FERM P-6548	2.5×10^8	0.01
ビフィドバクテリウム・ロンガム ATCC15707	4.1×10^8	0.01
ビフィドバクテリウム・ロンガム ATCC15708	1.1×10^8	<0.001
ビフィドバクテリウム・ロンガム ATCC55817	2.8×10^8	21.3

ビフィドバクテリウム・ロンガム FERM P-6548 : 引用文献 1 記載菌株

ビフィドバクテリウム・ロンガム ATCC55817 : 引用文献 2 記載菌株

以上のように、本発明のビフィドバクテリウム・ロンガム FERM BP-7787 菌株は、乳性培地中で強い発酵性及び酸性下での保存中において優れた生残性を有し、さらに人工胃液に対して強い耐性を示すことから、ビフィドバクテ

リウム・ロンガムの基準株又は今まで公知の菌株に見られなかった性質を持っていることが明らかである。一方、胃酸耐性能を有することが知られているATCC 55817株は、乳性培地中での発酵性、酸性下での保存中における生残性は極めて悪く、本発明のFERM BP-7787株に比較して著しく劣っていた。

本発明のビフィドバクテリウム・ロンガムは、自然界から分離したビフィドバクテリウム・ロンガムの中から、発酵性、耐酸性及び胃酸耐性能を有するものを選び出し得られたものである。したがって、本発明のビフィドバクテリウム・ロンガムは、短時間で迅速に培養することができ、培養物又はその加工物の保存中における生菌数の低下が少なく、広いpH域の飲食物への利用が可能である。

また、本発明のビフィドバクテリウム・ロンガムは、凍結や凍結乾燥したときの生残率も優れていることが試験で確認されているので、菌末の形態で用いることもできる。さらに、本発明のビフィドバクテリウム・ロンガムは、胃酸耐性能を有し、人又は動物の体内に摂取された場合、高い確率で生きて消化管（腸管）に到達し、生理機能を発揮し得るため、産業上きわめて有用である。例えば、古くから知られている人や動物の医薬品としての整腸剤に使用することは勿論、粉末状の食品、飼料あるいは液状又は半固形状の飼料、食品に添加あるいは混在させることもできる。

以下に実施例を示し、本発明をさらに詳細に説明する。

実施例 1

酵母エキス0.2% (W/W)、脱脂粉乳11% (W/W) からなる90℃、30分殺菌後の培地1000mlに、本発明のビフィドバクテリウム・ロンガムFERM BP-7787菌株を接種し、37℃6時間培養した。一方、10% (W/W) 還元脱脂乳培地1500mlを90℃、30分間殺菌し、ストレプトコッカス・サーモフィルス（ハンセン社製）及びラクトバチルス・デルブリュッキイ・サブスピシーズ・ブルガリクス（ハンセン社製）の混合カルチャー50mlを接種し、42℃で5時間培養した。

これとは別に乳脂肪3.0% (W/W)、無脂乳固形分9% (W/W) からなる

生乳50Lを70℃に加温し、15MPaの圧力で均質し、90℃で10分間殺菌し、40℃に冷却した。この殺菌したベースに、前記の通り前培養した本発明のビフィドバクテリウム・ロンガムFERM BP-7787菌株のカルチャー750ml及びストレプトコッカス・サーモフィルスとラクトバチルス・デルブリュッキイ・サブスピシーズ・ブルガリクスとの混合カルチャー300mlを接種し、500ml容の容器に充填し、密封し、37℃で5時間培養し、直ちに冷却した。得られた発酵乳は、乳酸酸度0.81%、pH4.55であり、ビフィドバクテリウム・ロンガムFERM BP-7787菌株 2.3×10^8 /ml、ストレプトコッカス・サーモフィルス 6.8×10^8 /ml、ラクトバチルス・デルブリュッキイ・サブスピシーズ・ブルガリクス 3.4×10^7 /mlを含有していた。この発酵乳を10℃で14日間保存した時のビフィドバクテリウム・ロンガムFERM BP-7787の菌数は 1.5×10^8 /mlであり、生残率は65%であった。

実施例2

肉エキス50g、酵母エキス100g、ペプトン100g、乳糖200g、 K_2HPO_4 50g、 KH_2PO_4 10g、シスチン4g及び水9.5Lの組成からなる培地で、37℃、16時間、前培養した本発明のビフィドバクテリウム・ロンガムFERM BP-7787菌株のシードカルチャー500mlを、前記の培地10Lに接種し、37℃で16時間培養した。更に、90℃で30分殺菌した前記培地と同一組成の培地200Lに、前記培養液全量(10.5L)を接種し、37℃で16時間培養した。培養後の生菌数は 3.0×10^9 /mlであった。

次いで、シャープレス型遠心分離機(15000rpm)により菌体を集め、培地に同量の90℃、30分間殺菌の生理食塩水に再懸濁し、前記と同様遠心分離して再度集菌した。得られた菌体を脱脂粉乳10%(W/W)、蔗糖1%(W/W)、グルタミン酸ソーダ1%(W/W)からなる溶液(90℃30分殺菌)20Lに懸濁し、常法に従って凍結乾燥し、 1.6×10^{10} /gの本菌を含む粉末約2.2kgを得た。

実施例 3

乾燥殺菌した澱粉 14 kg 及び乳糖 6 kg に、実施例 2 で得られた本発明のビフィドバクテリウム・ロンガム FERM BP-7787 菌株を含む粉末 20 g を加えて均一に混合し、 $1.0 \times 10^8 / g$ の本菌を含有する粉末の整腸剤約 20 kg を得た。

実施例 4

酵母エキス 0.2 % (W/W)、脱脂粉乳 11 % (W/W) からなる 90℃、30 分殺菌後の培地 1000 ml に、本発明のビフィドバクテリウム・ロンガム FERM BP-7787 菌株を接種し、37℃、6 時間培養した。一方、酵母エキス 0.6 % (W/W) 入り 10 % (W/W) 還元脱脂乳培地 1000 ml を 90℃、30 分間殺菌し、ストレプトコッカス・クレモリス (*Streptococcus cremoris*、ハンセン社製) のカルチャー 30 ml を接種し、30℃で 16 時間培養した。

これとは別に、乳脂肪 0.5 % (W/W)、無脂乳固形分 8.5 % (W/W)、蔗糖 6.5 % からなる生乳 50 L を 70℃に加温し、15 MPa の圧力で均質化処理し、90℃で 10 分間殺菌し、33℃に冷却した。この殺菌したベースに、前記の通り前培養を行った本発明のビフィドバクテリウム・ロンガム FERM BP-7787 菌株のカルチャー 750 ml 及び前記の通り前培養を行ったストレプトコッカス・クレモリスのカルチャー 500 ml を接種し、30℃で 16 時間培養し、直ちに攪拌冷却した。冷却発酵乳を 15 MPa の圧力で均質化処理し、200 ml 容量のガラス容器に充填し、密封し、ドリンクヨーグルトを得た。

得られた発酵乳は乳酸酸度 0.70 %、pH 4.55 であり、ビフィドバクテリウム・ロンガム FERM BP-7787 菌株 $1.5 \times 10^8 / ml$ 、ストレプトコッカス・クレモリス $9.8 \times 10^8 / ml$ を含有していた。この発酵乳を 10℃で 14 日間保存した時のビフィドバクテリウム・ロンガム FERM BP-7787 菌株の菌数は $8.5 \times 10^7 / ml$ であり生残率は 57 % であった。

産業上の利用の可能性

本発明のビフィドバクテリウム・ロンガムは、乳性成分培地において高い発酵性及び生残性、さらに人工胃液に対して強い耐性を有する。したがって、本発明菌の培養物の調製は短時間で迅速にでき、培養物又はその加工物の保存中における生菌数の低下が少なく、広いpH域の飲食物への利用が可能である。さらに本発明菌は、胃酸耐性能を有し人又は動物の体内に摂取された場合、高い確率で生きて消化管（腸管）に到達し、生理機能を発揮することが考えられ、産業上きわめて有用である。

請求の範囲

1. 下記の菌学的性質を有するビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*)。
 - (1) 乳性培地を p H 4. 6 以下にする発酵性、
 - (2) 乳性培地で p H 4. 4 ~ 4. 6 に達した時に急冷して 1 0 °C、2 週間保持した時の生残率が 5 0 % 以上である、
 - (3) p H 3. 0 の人工胃液で 3 7 °C、2 時間保温した時の生残率が 1 0 % 以上である胃酸耐性能。
2. 菌株が、ビフィドバクテリウム・ロンガム FERM BP - 7 7 8 7 である請求項 1 に記載のビフィドバクテリウム・ロンガム。
3. 請求項 1 又は 2 に記載のビフィドバクテリウム・ロンガムを含有する菌末。
4. 請求項 1 又は 2 に記載のビフィドバクテリウム・ロンガムを含有する飲食品。

要 約 書

本発明は、下記の菌学的性質を有するビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*)、ならびに、かかるビフィドバクテリウム・ロンガムを含有する菌末および飲食品を提供する。

- (1) 乳性培地を pH 4.6 以下にする発酵性、
- (2) 乳性培地で pH 4.4 ~ 4.6 に達した時に急冷して 10℃、2 週間保持した時の生残率が 50% 以上である、
- (3) pH 3.0 の人工胃液で 37℃ 2 時間保温した時の生残率が 10% 以上である胃酸耐性能。